

**Univerzita Karlova**  
**Přírodovědecká fakulta**  
Biochemie



**Příprava expresního konstruktů a izolace xNEIL3 glykosylasy**

**Preparation of expression construct and purification of xNEIL3  
glycosylase**

Barbora Landová

**Bakalářská práce**

**Vedoucí práce**

Prof. RNDr. Tomáš Obšil, Ph. D.

Praha, 2017

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením konzultanta RNDr. Mgr. Jana Šilhána, Ph.D. a všechny použité prameny jsem řádně citovala.

V Praze dne 18. května 2017

podpis:

Tímto bych chtěla poděkovat svému konzultantovi RNDr. Mgr. Janu Šilhánovi, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady, čas a ochotu, se kterou se mi věnoval v průběhu celé práce. Dále děkuji všem členům laboratoře za vytvoření příjemné pracovní atmosféry a ochotu vždy pomoci, poradit.

V neposlední řadě děkuji svému vedoucímu práce prof. RNDr. Tomáši Obšilovi, Ph. D. za ochotu a vstřícnost.

## **Abstrakt**

DNA glykosylasy jsou důležité proteiny sloužící k rozpoznání a odstranění poškození DNA, vznikající samovolně nebo působením environmentálních činidel. Do Fpg/Nei rodiny patří proteiny schopné rozpoznávat a přispět k opravě oxidované báze, abazického místa nebo kovalentního příčného spojení řetězců DNA pomocí zatím neobjasněné opravné dráhy. Bez opravy tohoto poškození nemůže docházet k replikaci a může vést k mutacím a rakovině.

Tato práce se snaží přispět k objasnění molekulárních mechanismů interakce NEIL3 (Endonukleasa VIII – like 3) z rodiny proteinů Fpg/Nei se substrátem – kovalentní spojení opačných řetězců DNA.

## **Abstract**

DNA glycosylases are important enzymes responsible for the recognition and removal of base DNA damage. These DNA lesions are formed spontaneously or as an effect of environmental agents. NEIL3 (Endonuklease VIII – like 3) enzyme belongs to a Fpg/Nei family of glycosylases implicated in the DNA repair of oxidative bases, abasic sites. Recently, it has been shown that these enzymes are capable of removal of one type of interstrand crosslink by so unknown repair pathway. Unrepaired DNA crosslinks block DNA replication and may lead to cell death or severe chromosomal damage and later even cancer.

This thesis is focused on revealing molecular mechanisms of the interstrand DNA-DNA cross-link repair by NEIL3 glycosylase. (In Czech)

## OBSAH

1. Teoretický úvod.....	8
1.1. Poškození DNA .....	8
1.2. ICL .....	9
1.3. Fanconiho anémie .....	11
1.4. Oprava ICL .....	11
1.5. DNA glykosylasa .....	12
1.6. Fpg/Nei rodina .....	12
1.6.1. Fpg .....	13
1.6.2. NEIL1 .....	13
1.6.3. NEIL2 .....	13
1.6.4. NEIL3 .....	14
2. Cíle bakalářské práce.....	15
3. Materiály a přístroje .....	16
3. 1. Použité sekvence a konstrukt.....	20
4. Metody.....	22
4.1. Příprava vektoru pro bakteriální expresi xNEIL3 .....	22
4.1.1. Polymerázová řetězová reakce (PCR) .....	22
4.1.2. Horizontální agarosová elektroforesa .....	22
4.1.3. Izolace PCR produktu .....	23
4.1.4. Štěpení plasmidu a produktu PCR restrikčními enzymy .....	23
4.1.5. Ligace.....	23
4.1.6. Transformace bakterií <i>Escherichia coli</i> ( <i>E. coli</i> ) DH5 $\alpha$ .....	24
4.1.7. PCR z kolonií .....	24
4.1.8. Sekvenování plasmidové DNA.....	25
4.2. Bakteriální exprese .....	25
4.2.1. Exprese rekombinantního proteinu v buňkách <i>E. coli</i> BL21 (DE3) NiCo .....	25
4.3. Izolace proteinu .....	26
4.3.1. Centrifugace.....	26
4.3.2. Lyse buněk.....	26

4.3.3.	Chromatografie na iontoměničích .....	26
4.3.4.	Diskontinuální elektroforesa v denaturačním prostředí dodecylsiranu sodného (SDS-PAGE) .....	27
4.3.5.	Koncentrování proteinu .....	27
4.3.6.	Gelová permeační chromatografie .....	27
4.4.	Tvorba a izolace ICL .....	28
4.4.1.	Hybridizace oligonukleotidů .....	28
4.4.2.	Diskontinuální elektroforesa v denaturačním prostředí 7 M Urea .....	28
4.4.3.	Izolace ICL .....	28
4.4.4.	Tvorba ICL – optimalizace inkubace .....	29
4.4.5.	Interakce ICL na xNEIL3 K60A 264 stop .....	29
5.	Výsledky .....	30
5.1.	Příprava vektoru pro bakteriální expresi xNEIL3 K60A 264 stop .....	30
5.2.	Exprese a izolace xNEIL3 K60A 264 stop .....	31
5.2.1.	Exprese .....	31
5.2.2.	Izolace čistého proteinu .....	32
5.3.	Příprava ICL .....	35
5.4.	Izolace substrátu – ICL .....	35
5.5.	Optimalizace doby inkubace pro maximální výtěžek tvorby ICL .....	36
5.6	Interakce xNEIL3 K60A 264 stop s ICL .....	37
6.	Diskuse .....	39
7.	Závěr .....	41
	Bibliografie .....	42
	Přílohy .....	45

## Seznam zkratek

Ap	abazické místo (z angl. Apurinic/apirimidinic)
BER	opravná dráha pro opravu bází (z angl. base extinction repair)
CBBR250	Coomassie Brilliant Blue R 25
dA	2'-deoxyadenosin
DNA	deoxyribonukleotidová kyselina
dsDNA	dvouřetězcová DNA (z angl. double-stranded DNA)
EDTA	Ethilendiamin tetraoctová kyselina
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
FA	Fanconiho anémie
FL	délka celého řetězce (z angl. Full length)
Fpg	formamidopirimidin DNA glykosylasa
HEX	Hexachlorofluorescein
HR	homologní rekombinace
ICL	příčné spojení protilehlých řetězců DNA (z angl. interstrand cross-link)
Nei	endonukleasa VIII
NEIL1	endonukleasa VIII-like I
NEIL2	endonukleasa VIII-like II
NEIL3	endonukleasa VIII-like III
Nth	endonukleasa III
NER	opravná dráha pro opravu nukleotidů (z angl. nucleotide extinction repair)
UV	ultrafialové (z angl. ultraviolet)
SDS	Dodecylsírán sodný
ssDNA	jednořetězcová DNA (z angl. single-stranded DNA)
TCEP	Tris(2-karboxyethyl)fosfin
TEMED	Tetramethylethylendiamin

# 1. Teoretický úvod

## 1.1. Poškození DNA

Poškození DNA vzniká působením environmentálních činidel, chybami při replikaci nebo běžným působením celulárního metabolismu. Je složité ho odstranit a zachovat originální genetickou informaci, protože nedokonalosti při opravě vedou ke genomové nestabilitě, rakovině nebo smrti buňky<sup>1</sup>.

DNA polymeráza, jejíž chybovost je 1 chyba na  $10^7$  syntetizovaných bází, je schopna kontrolovat sama sebe a chyby vzniklé při replikaci z 99% opravovat<sup>2</sup>.

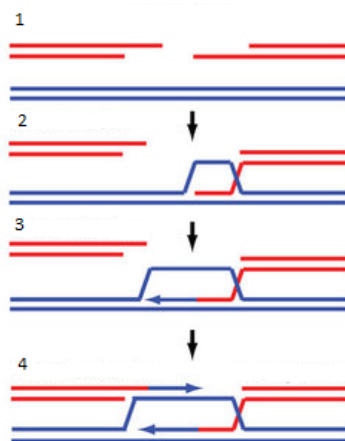
DNA je nestabilní molekula, ve které neustále dochází ke vzniku různých chyb a poškození a to jak spontánně, tak vlivem působení různých činidel. Za výzkum spontánních jevů se zasloužil laureát Nobelovy ceny z roku 2015 prof. T. R. Lindahl. Z jeho práce vyplývá, že spontánní odstranění purinových bází nezávisí na sekvenci DNA<sup>3</sup>.

V molekule DNA dochází ke spontánnímu deaminaci za vzniku uracilu, který je tudíž mutagenní, jelikož není zachována originální genetická informace. Reakcemi s hydroxylovými radikály vznikají vedlejší produkty normálního oxidačního metabolismu a vznikají kovalentní spojení DNA. Intercelulárním působením malých metabolitů a koenzymů vznikají rozmanitá poškození DNA<sup>4</sup>.

K opravě různých typů poškození byly objeveny specializované opravné dráhy jako např. oprava nukleotidů (NER z angl. Nucleotide excision repair), oprava bází (BER z angl. Base excision repair), Fanconiho opravná dráha (FA z angl. Fanconi anemia), oprava špatně párovaných bází (MMR z angl. Mismatch repair)<sup>1</sup>. Poškození jednotlivé báze je opravováno pomocí BER. Rozměrná poškození, kovalentní spojení DNA s proteinem menším než 11 kDa a poškození způsobená působením UV záření, které způsobuje spojení dvou sousedících pyrimidinových bází, je opravováno pomocí NER<sup>2</sup>. Kovalentní spojení DNA s proteinem větším než 11 kDa a poškození typu zlomu na jednom nebo obou řetězcích je možno opravit specializovaným



systémem degradace proteinu a následné homologní rekombinace (HR), viz obr. 1.1<sup>5</sup>. FA je zaměřena na opravu příčného kovalentního spojení mezi protilehlými řetězci (ICL z angl. Interstrand cross-link)<sup>6</sup>.



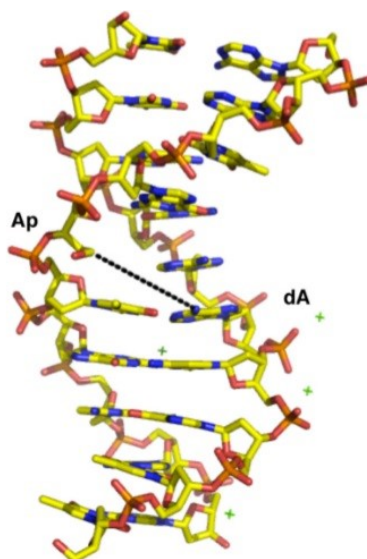
**Obrázek 1.1** Homologní rekombinace

- 1) červeně ssDNA konce a modře dsDNA sesterské chromatidy.
- 2) Zásah sesterské DNA.
- 3) prodlužování řetězce podle templátu sesterské DNA.
- 4) Syntéza chybějících kusů. Následuje oddělení sesterských chromatid, nově syntetizované kusy DNA jsou ligovány a poškozená DNA je opravena<sup>7</sup>.

BER je důležitý pro odstranění poškozených bází způsobené buněčným metabolismem<sup>1</sup>. Oprava poškozené DNA probíhá ve třech krocích. V prvním kroku rozpozná poškození a odstraní kovalentní vazbu za vzniku mezery nazývané se abazické místo (Ap z angl. Apurinic/apyrimidinic site). Ve druhém kroku je Ap opraveno pomocí DNA polymerázy. Ve třetím kroku je řetězec spojen DNA ligázou. K prvnímu kroku mohou být využívány různé nukleasy v závislosti na typu poškození<sup>8</sup>.

## 1.2. ICL

Při reakci jistých endogenních či exogenních činidel s DNA může vznikat ICL mezi bázemi na protilehlých řetězcích DNA, viz obr. 1.2 str. 10.

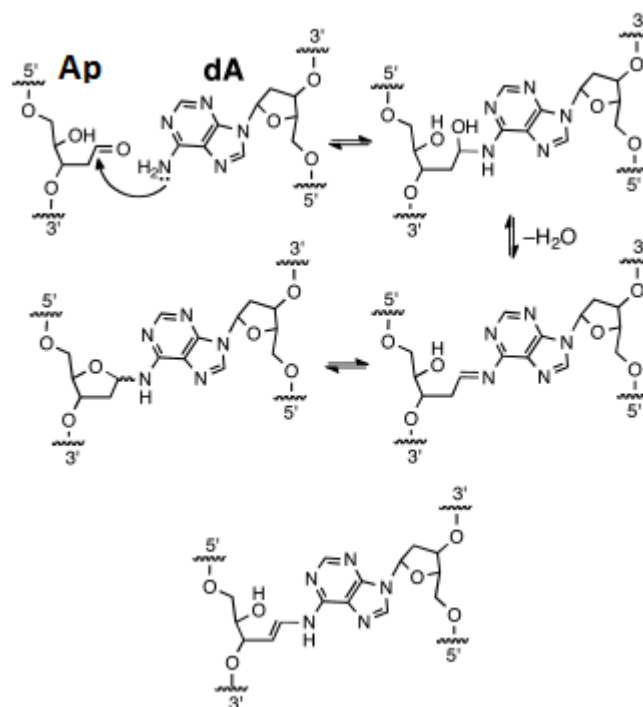


**Obrázek 1.2** Model Ap-ICL mezi opačnými řetězci vytvořený v programu PyMol. Spojení se vytvořilo mezi abazickým místem (Ap) a adeninem (dA)<sup>9</sup>.

ICL je vysoce cytotoxické poškození<sup>6</sup>. Vzniká působením různých exogenních činidel zahrnující dusíkatý hořčičný plyn yperid, cisplatinu, mitomycin C a psolaren<sup>10</sup>. Vzniká také působením endogenních činidel, mezi která patří např. formaldehyd, acetaldehyd a malondialdehyd<sup>11</sup>.

Působením exogenních činidel se výrazně zvyšuje četnost vzniku ICL, což vede ke zvyšujícímu se počtu buněk podstupujících apoptózu<sup>12</sup>. Po 4 hodinách inkubace nerezistentních ovariálních buněk s cis-platinou (Cis-Pt) bylo dosaženo IC50. Koncentrace potřebná k usmrcení 50% těchto buněk je 2,5 pg Cis-Pt/ 1 µg DNA<sup>13</sup>. Tohoto faktu je využíváno při chemoterapii, kdy uvedená činidla působí na nádorové buňky a způsobují jejich odumírání<sup>14</sup>.

Ap je pravděpodobně nejčastější endogenní poškození buněčné DNA. Vzniká spontánním odstraněním purinových a pyrimidinových bází, a rovněž jako produkt opravné dráhy BER, kdy jsou odstraňovány poškozené báze působením oxidace mutagenů, toxinů a protirakovinných drog<sup>9</sup>. Odhaduje se, že každá savčí buňka v ustáleném stavu obsahuje cca 100 000 Ap<sup>15</sup>. Nedávno bylo objeveno, že jedna z forem ICL je tvořena mezi Ap a bází na protilehlém řetězci, viz obr. 1.3, str. 11.



**Obrázek 1.3** Tvorba ICL mezi Ap a dA

Schéma navázání dA na Ap přes 3 intermediáty za vzniku konečného produktu – Ap-ICL. Zobrazeno je pouze Ap a nukleotid, které jsou součástí řetězců DNA<sup>9</sup>.

### 1.3. Fanconiho anémie

Genetická porucha Fanconiho anémie je charakteristická aplastickou anémií, rakovinou predispozicí a hypersenzivitou na ICL<sup>16</sup>.

Bylo objeveno 19 „FANC“ proteinů, jejichž mutace indikuje FA. FA způsobuje selhání kostní dřeně a predispozice pro rakovinu. Klíčovým faktorem této opravné cesty je heterodimer FANCI-D2, jehož mono-ubikvytilace ochraňuje buňky před ICL způsobujícími činidly<sup>17</sup>.

### 1.4. Oprava ICL

Oprava ICL probíhá v S fázi buněčného cyklu a u některých typů jako Ap-ICL neznámým mechanismem. Z genetických studií jsou získána důležitá vodítka, která ukazují několik tříd proteinů, které udělují rezistenci proti ICL tvořícím činidlům.

Oprava je iniciována nárazem DNA replikační vidličky na ICL. Endonukleasy způsobí rozštěpení dvoušroubovice a tím uvolní jednu ze sesterských chromatid. U neporušené chromatidy se rychle obnoví replikace a vznikne dceřiná dvoušroubovice. Druhá, porušená chromatida je opravena pomocí HR. K opravení odštěpeného zbytku ICL je využito NER. Detailní mechanismus této opravné dráhy není dostatečně prozkoumán<sup>6</sup>.

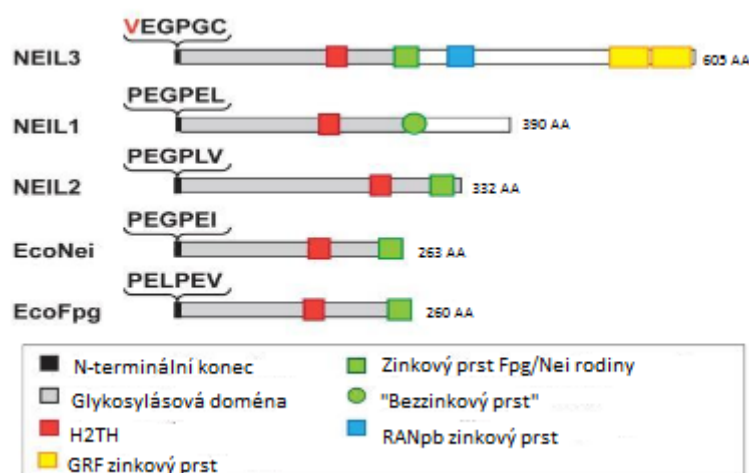
Pro jistotu, že je poškození opraveno může na určité poškození být aplikováno více opravných cest. Pokud nějaká z nich nefunguje řádně, jiná cesta ji v některých případech může nahradit. Různé opravné cesty mohou na opravě konkrétního poškození spolupracovat.

### **1.5. DNA glykosylasa**

DNA glykosylasa zachovává integritu DNA rozpoznáním poškozené báze způsobené ionizujícím zářením, alkylací nebo oxidačními činidly. Navzdory názvu některých glykosylas se jedná o nukleasu. Iniciuje proces opravy báze (BER enzym), která je dokončena pomocí enzymů jako fosfodiesterázy, Ap endonukleasy, DNA polymerasy a DNA ligasy. DNA glykosylasa štěpí N-glykosylovanou vazbu mezi cukrem a poškozenou bází vytvořením Ap<sup>18</sup>.

### **1.6. Fpg/Nei rodina**

Fpg/Nei rodina je jedna ze dvou rodin, které jsou schopny rozpoznat oxidované báze DNA. Druhou rodinou je HhH/GPD<sup>19</sup>. HhH rodina je reprezentována endonukleasou III (Nth) a 8-oxoguanin DNA glykosylasou (Ogg1). Fpg/Nei rodina je reprezentována formamidopirimidin DNA glykosylasou (Fpg) a endonukleasou VIII (Nei) v bakteriích nebo endonukleasou VIII-like 1 (NEIL1), NEIL2, NEIL3 u savců<sup>20</sup>. Tyto glykosylasy nevytvářejí Ap místo, ale mají spřaženou lyasovou aktivitu, jež hydrolyzuje diesterovou vazbu poškozeného řetězce. Na obrázku 1.4 (str. 13) je schématické znázornění sekvence některých proteinů náležících ke zmíněným rodinám.



**Obrázek 1.4** Schematické znázornění NEIL1, NEIL2, NEIL3, *E. coli* NEI a Fpg. První aminokyselina na N-konci je nezbytná pro katalytickou aktivitu<sup>21</sup>.

### 1.6.1. Fpg

Fpg rozpoznává především poškození purinů<sup>22</sup>. V pořadí 2. aminokyselina prolin je využita k tvorbě Shiffovy báze, 3. Aminokyselina kyselina glutamová slouží jako donor protonu. Patří mezi BER enzymy schopné ochránit Ap před vznikem Ap-ICL<sup>23</sup>.

### 1.6.2. NEIL1

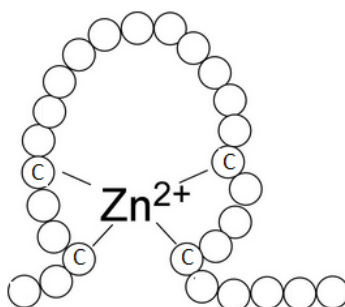
NEIL1 (Endonukleasa VIII-like I) má 44 kDa a má totožnou aktivitu při odstraňování poškození jako Fpg, obě preferují otevřený kruh purinů jako je 4,6-diamino-5-formamidopyrimidin (Fapy A). NEIL 1 je charakteristický nepřítomností smyčky nesoucí zinek. NEIL 1 se účastní humorální imunity a je vysoce tvořen v B buňkách<sup>21</sup>.

### 1.6.3. NEIL2

NEIL2 (Endonukleasa VIII-like II) má 37 kDa. Funkce NEIL2 je komplementární k funkci NEIL1, přesto mezi nimi existují podobnosti. Oba mají na N-terminálním konci prolin v pozici 2, který zajišťuje jejich glykosylasovou aktivitu.

#### 1.6.4. NEIL3

NEIL3 (Endonukleasa VIII-like III) má 68 kDa. Lidský NEIL3 se nachází na chromosomu 4q34.3 a sestává se z 10 exonů obsahujících 1818 párů bází v kódující sekvenci, což umožňuje plnou délku proteinu 605 aminokyselin. NEIL3 se vyskytuje především v jádru buněk<sup>21</sup>. Obsahuje zinkový prst, obr. 1.5, což je doména vázající DNA, která se často vyskytuje u DNA vázajících proteinů<sup>24</sup>. V případě NEIL3 je zinek ukotven čtyřmi cysteiny.



**Obrázek 1.5** Zinkový prst uchycený čtyřmi C = cystein<sup>24</sup>.

NEIL3 obsahuje C-terminální doménu skládající se z Ranbp zinkového prstu a GRF zinkového prstu. Na N-terminálním konci v pozici 2 se nachází valin na místo obvyklého prolinu. Tuto aminokyselinu využívá k tvorbě Shiffovy báze.

xNEIL3 je jedna z 11 anotovaných glykosylas v genomu drápatky vodní (*Xenopus leavis*) a členem Fpg/Nei glykosylasové rodiny, které byla dokázána schopnost odstranit oxidovanou bázi z ssDNA<sup>17</sup>. Aminokyselina lysin v pozici 60 představuje aktivní centrum.

## 2. Cíle bakalářské práce

Cílem této práce je připravit mutantní varianty proteinu xNEIL3 a exprimovat je v bakteriích *E.coli*. Připravit jeho substrát ICL a zjistit, zda se mutant na substrát váže a poškození opravuje.

Dosažení tohoto cíle zahrnovalo dílčí kroky:

- příprava expresního vektoru po bakteriální expresi mutantní varianty xNEIL3
- bakteriální exprese a izolace mutantní varianty xNEIL3
- příprava a izolace substrátu ICL z abazické DNA
- charakterizace interakce mutantní varianty xNEIL3 různých DNA substrátů

### 3. Materiály a přístroje

**Tabulka 3.1** Přístroje a pomůcky

Analytické váhy	Adventurer Pro, Ohaus
Aparatura a zdroj pro horizontální elektroforesu	EV 231, Consort
Aparatura pro vertikální elektroforesu	Mini-PROTEIN Tetra System, Bio-Rad
Centrifugy	Centrifuge 5418, rotor FA-45-18-1, Eppendorf centrifuge 5418 Allegra X-15 R Centrifuge, rotor SX47910A, Beckmann Coulter Sorval Evolution RC, rotor SLC-6000, Thermo Scientific Avanti Centrifuge J30I, rotor JLA-16.250, Beckmann Coulter
Sonikátor	Bandelin sonopro
Fotoaparát	E-620, Olympus
FPLC	AKTA purifier, GE Healthcare Life Sciences
Kolona pro gelovou chromatografii	HiLoad™ 16/600 Superdex™ 75 pg, GE Healthcare Life Sciences
Kolony pro iontovou chromatografii	Ohp Shp; monoS, GE Healthcare
Koncentrátor	Amicon® Ultra 30 kDa, Millipore Ireland Ltd. Amicon®Ultra 3K, centrifuge filters, Millipore Ireland Ltd.
Magnetická míchačka	ARE, VELP



Mikroskop	SZX10, Olympus
pH metr	HI 3220 pH / ORP Meter, HANNA instrument
Vortex	Gene 2, Scientific Industries
Inkubátor	Memmert IPP 400
Mikrospektrofotometr	Spectrophotometer ND-1000, Nanodrop
Předvážky	EMB 500-1, Kern
Rotační inkubátor	Innova 44, New Brunswick
Rotátor	Multi RS-60, Biosan
Fluorescenční skener	TYPHOON FLA 9500
Termocykler	Professional TRIO Thermocycler, Biometra Product Line Block heater, SBH130D, P-Lab

**Tabulka 3.2** Komerčně dostupné chemikálie

Agarosa	Agarosa SERVA pro DNA elektroforezu, SERVA
Akrylamid, Bisakrylamid	Rotiphorese gel 30 (37,5:1), Carl Roth
Ampicilin	Carl Roth
B-merkaptoethanol	Sigma-Aldrich
Coomassie Brilliant Blue G 250	Sigma-Aldrich
EDTA (ethylendiamin tetraoctová kyselina)	Carl Roth
Ethidium bromid	Carl Roth
HCl	PENTA
Peroxodisíran amonný	Carl Roth
SDS	Carl Roth

Standard pro DNA elektroforesu	Gene Ruler™ 1 kb Plus DNA Ladder, Thermo Scientific
Standard pro proteinovou elektroforesu	PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder, 10-250 kDa, Thermo Scientific
TCEP	Thermo Scientific
TEMED	Carl Roth
Tris-Cl	Carl Roth

**Tabulka 3.3** Pufry, roztoky, média

CBB barvicí roztok	3 mM Coomassie Brilliant Blue R250, 1,5 M CH <sub>3</sub> COOH, 50% (v/v) methanol
Eluční pufr pro xNEIL3	20 mM Tris pH 8,0; 1 M NaCl; 10% Glycerol; 2 mM β-Merkaptoetanol
Eluční pufr pro ICL	20 mM Tris pH 8,0; 1 mM EDTA
Ligační pufr	5 x Rapid Ligation pufr, Thermo Scientific
LB agar podle Lennox	P-Lab
LB medium podle Lennox	P-Lab
Nanášecí pufr pro DNA elektroforesu	6x DNA Loading Dye, Thermo Scientific
Nanášecí pufr pro SDS elektroforesu	4x Roti Load®1, Carl Roth
Promývací pufr pro xNEIL	20 mM Tris pH 8,0; 150 mM NaCl; 10% Glycerol; 2 mM β-Merkaptoetanol
Promývací pufr pro ICL	20 mM Tris pH 8,0; 1 mM EDTA; 1 M NaCl
TE	20 mM Tris pH 8,0; 1 mM EDTA
Pufr pro gelovou chromatografií	20 mM Tris pH 7,4; 50 mM NaCl, 2 mM β-merkaptopetanol

Pufr pro SDS elektroforesu (Tris-glycinový pufr)	25 mM Tris NaCl, 0,25 M glycin, 0,1 % (w/w) SDS, pH 8,8
TBE pufr	89 mM Tris, 89 mM kyselina boritá, 2 mM EDTA, pH 8,3
Restrikční pufr	10x Fast Digest Green pufr, Thermo Scientific
ZY médium	1 % (w/v) trypton; 0,5% (w/v) kvasničný extrakt; 2,8 mM glukosa; 6 mM laktosa; 0,5% (v/v) glycerol; 1 mM MgCl <sub>2</sub> ; 25 mM (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ; 50 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; 50 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>

**Tabulka 3.4** Složení gelů na DNA

Denaturující	1x TBE 7 M Močovina 20% (v/v) Akrylamid / Bisakrylamid (37,5 : 1)
Nativní	1x TBE bez EDTA 20% (v/v) Akrylamid / Bisakrylamid (37,5 : 1)

**Tabulka 3.5** Složení gelů na SDS-PAGE

Zaostřovací	125 mM Tris-Cl pH 6,8 4 % (v/v) Akrylamid / Bisakrylamid (37,5 : 1) 0,1 % (w/v) SDS 0,005 % (v/v) TEMED 0,05 % (w/v) (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>8</sub>
-------------	--

Dělicí	375 mM Tris-Cl pH 8,8 15 % (w/v) Akrylamid / Bisakrylamid (37,5 : 1) 0,1 % (w/v) SDS 0,001 % (v/v) TEMED 0,05 % (w/v) (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>8</sub>
--------	--

### 3. 1. Použité sekvence a konstrukt

**Tabulka 3.6** Sekvence primerů

Primer dle směru replikace	Sekvence (5'-3')
NEIL3 NdeI forwardní	GAGATATACATATGGTGGAGGGTCCGGGC
NEIL3 HindIII reverzní	GCGGCCGCAAGCTTCTACTTTTGGCACTTGGG AC
T7 reverzní	TAATACGACTCACTATAGGG

**Tabulka 3.7** Sekvence oligonukleotidů použitých pro přípravu ICL

Značení	Sekvence (5'-3')
Neznačené	GGATGAACUTAGACAGA
Neznačené komp.	CTCTGTCTAAGTTCATC
Značené	[HEX]-AGATGAACUTAGACAGA
Značené komp.	TCTGTCTAAGTTCATCT

### Konstrukt DNA xNEIL3 K60A 264 stop

ATGGTGGAGGGTCCGGGCTGCACGCTGAATGGGGAGAAGATCCGAGCG  
CGGGTGCAGAAGGGTCAGTGTGTCGTGGAGCTTCGGGGAAGCGCTGTG  
AGCGCTAAGGCCCTGCTTCCTCCCATAATGACCTATCATCACTTACTGG  
ATGCAGCTACGCTGGAGTGGAAACGCTGGGAAAGGAGCTTTTTATATAT  
TTTGGACTGAAAGCAATGCGTGTACATTTTGGGAATGAATGGATCAATGC  
GCATTAATCAACCAATGAAAAAGGGCCAAGAAAACGGTAGACCCATAC  
CTATAGCGGTTTTAGAAAGTGCAACTTACAAAAGACTTAATTTGCTTTTAT  
GAGTCCACTGTAGATGTGAGAAATGCATCAGAATGTCAAGAAAAGATA  
AGATTCTTTGAGGAACCTTGATGTCTGCTCTTCTAAGTTTAGTTTTCCTAG  
AGCAGAATGTGAGATCAAGAAGCAACGTACTCGCATGCTATGCGACATT  
CTGCTTGATCAGATGATTCTACCTGGGGTTGGGAACATTATTAAAAATG  
AAGCCTTATTTGACAGTGGTCTACACCCTGGAGTCCAGGCTGGTCTACTT  
ACAGATGAGCAAGTGAGTCACCTTGTGAAAATGACCCGTGATTTCACTC  
TGCTTTTTTATAAGTGTGCGAAAGTCTGGTTCTGCTCTCTATAAACTAC  
AAGGTTTACAAAAGACCTAATTGTGGCCAGTGTGGTACAAAGATCACTG  
TGTGTCGTCTTGGTGAGCACACAGGATGACCTATTTTGTCCCAAGTGC  
CAAAAG

### Aminokyselinová sekvence xNEIL3 K60A

MVEGPGCTLNGEKIRARVQKGQCVVELRGS AVSAKAPASSHNDLSSLTGCS  
YAGVETLGAELFIYFGLKAMRVHFGMNGSMRINQPMKKGQENGRPIPIAVL  
EVQLTKDLICFYESTVDVRNASECQEKIRFFEELDVCSSKFSFPRAECEIKKQ  
RTRMLCDILLDQMILPGVGNIIKNEALFDSGLHPGVQAGLLTDEQVSHLVK  
MTRDFTLLFYKCRKSGSALYKHYKVYKRPNCGQCGTKITVCRLGEHNRMT  
YFCPKCQKDKPQHVDVSKLPTRNSLIGWVQRTASNANEHVATSKEEHWAC  
AVCTLINKPSDKQCDACLTLRPEVSSLAVSDEAAELNTDLVKYPCNNFAKV  
LPELKLNRRTAFGNTTLVLTDFGAKEGLADKNSQQNILNRSTFDVPLNNKY  
YHTKTPSNKRSNENEHWTNTLNAVNGHSAASN NVFNHPQKKLKTGHTTSN  
TIHLSSTISSPQSKMTGDAAAKTGNPQCSAHNVPCALQVVRKEGENKGRSF  
YTCSLPRERRCQYFEWADLHFPFCNHGKRCIVRTVLKIGPNNGKNFYVCPM  
GKDKQC NFFEWAKTEDYKDDDDK

## 4. Metody

### 4.1. Příprava vektoru pro bakteriální expresi xNEIL3

#### 4.1.1. Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Reakční směs pro amplifikaci DNA byla připravena podle tab. 4.1. Celkový objem reakce byl 20  $\mu$ l a reakce proběhla podle znázornění v tab. 4.2 v automatizovaném přístroji Professional TRIO Termocycler (tab. 3.1 str. 16).

**Tabulka 4.1** Složení reakční směsi PCR

Komponenty	Množství
Templátová DNA	1 ng
10 $\mu$ M forwardní primer	1 $\mu$ l
10 $\mu$ M revertní primer	1 $\mu$ l
2x Master Mix Phusion Flash	10 $\mu$ l
HPLC H <sub>2</sub> O	7 $\mu$ l

Nukleotidové sekvence primerů jsou uvedeny v tab. 3.6 str. 20.

**Tabulka 4.2** Průběh PCR reakce

Počet cyklů	Teplota / °C	Čas
1	98	1 min
30	98	10 s
	62	20 s
	72	15 s
1	72	5 min

#### 4.1.2. Horizontální agarosová elektroforesa

Na gel složený z 1% agarosy a 0,02% ethidium bromidu bylo nanášeno 2  $\mu$ l standardu Gene ruler a 2  $\mu$ l vzorku smíchaného se vzorkovým pufrem (5x DNA Loading Dye).

Elektroforesa proběhla v horizontálním uspořádání 15 minut při napětí 300 V v TAE pufru. Výsledný gel byl vizualizován pomocí UV fotoaparátu QUANTUM ST4-1100.

#### 4.1.3. Izolace PCR produktu

Zbylé množství PCR produktu bylo naředěno trojnásobným množstvím PB pufru a adsorbováno na silikagelovou mikrokolonku (QIAquick PCR Purification Kit<sup>25</sup>). Následně byly centrifugací odstraněny nečistoty promytím PE pufrem a DNA eluována TE pufrem.

#### 4.1.4. Štěpení plasmidu a produktu PCR restrikčními enzymy

Plasmid pET-21a(+), obr. P1., i PCR produkt byly štěpeny stejnými restrikčními endonukleasami v celkovém objemu 20 µl 60 min při 37 °C. Složení reakčních směsí je zaznamenáno v tab. 4.3. V případě plasmidu bylo po 30 min přidáno 1 µl telecí alkalické fosfatasy (CIAP).

**Tabulka 4.3** Složení reakčních směsí pro restrikční štěpení DNA

Komponenty	Plasmid	PCR produkt
DNA	3 µg	14 µl
Endonukleasa Nde I	0,5 µl	1 µl
Endonukleasa Hind III	0,5 µl	1 µl
10x Fast dig Green	1 µl	2 µl
CIAP	1 µl	-
HPLC H <sub>2</sub> O	6 µl	2 µl

#### 4.1.5. Ligace

Ligací DNA je myšleno vložení insertní DNA (v našem případě PCR produkt) do vektoru (př. plasmid). Insertní DNA i vektor naštěpené stejnými restrikčními enzymy

byly ligovány v reakční směsi podle tab. 4.4. Ligace probíhala při teplotě 37 °C 1 hod.

**Tabulka 4.4** Složení ligační směsi

Komponenty	V/μl
Vektor	10
Insert	10
5x ligační pufr	6
T4 DNA ligasa	1
HPLC H <sub>2</sub> O	3

Při přípravě ligační směsi bylo postupováno podle protokolu k T4 DNA ligase<sup>26</sup>.

#### **4.1.6. Transformace bakterií *Escherichie coli* (*E. coli*) DH5α**

Na ledu byl přidán 1 μl ligační směsi z kapitoly 4.1.5 str. 23 ke 20 μl buněčné suspenze chemicky kompetentních *E. coli* DH5 α a ponechán inkubovat na ledu 5 min. Následně byly buňky podrobeny teplotnímu šoku 42 °C po dobu 45 s a poté ponechány inkubovat na ledu 5 min. Po inkubaci bylo k buňkám přidáno 0,5 ml LB média a buňky byly kultivovány při 37 °C po dobu 1 hodiny. Směs byla rozetřena za aseptických podmínek na Petriho misku s LB agarem (finální koncentrace Ampicilinu, Kanamicinu, Gentamicinu). Následovala inkubace přibližně 12 hodin při 37 °C.

#### **4.1.7. PCR z kolonií**

Byly připraveny tři reakce podle tab. 4. 5. Do směsí byla pomocí špičky automatické pipety přidána a resuspendována část biomasy testovaných kolonií (viz kap. 4.1.6). Reakce proběhly za použití stejného programu uvedeného v tab. 4.2 str. 22 v automatizovaném přístroji Professional TRIO Thermocycler (tab. 3.1 str. 16). Produkty reakcí byly separovány a vizualizovány pomocí horizontální agarosové



elektroforesy za přítomnosti ethidium bromidu (kap. 4.1.2. str. 21). Plasmidová DNA byla izolována pomocí soupravy QIAprep SpinMiniprep Kit<sup>27</sup>.

**Tabulka 4.5** Složení PCR reakcí pro bakteriální kolonie

Komponenty	V/ $\mu$ l
Biomasa	-
Forwardní primer T7	0,5
Reversní primer T7	0,5
2x Dream Tag Green Master Mix, Thermo Scientific	5
HPLC H <sub>2</sub> O	4

#### 4.1.8. Sekvenování plasmidové DNA

V 1,5 ml mikrozkuhavce byla připravena reakční směs podle tab. 4.6. Sekvence byla provedena Sangerovou metodou firmou GATC Biotech.

**Tabulka 4.6** Složení sekvenační reakční směsi

Komponenty	V/ $\mu$ l
Plasmidová DNA	2,5
10 $\mu$ M primer	2,5
HPLC H <sub>2</sub> O	5

Příprava sekvenační směsi byla provedena podle doporučení GATC Biotech.

## 4.2. Bakteriální exprese

### 4.2.1. Exprese rekombinantního proteinu v buňkách *E. coli* BL21 (DE3) NiCo

Chemicky kompetentní buňky bakteriálního kmene *E. coli* BL21 (DE3) NiCo byly transformovány metodou teplotního šoku expresním vektorem o koncentraci. Při transformaci bylo postupováno analogicky jako v kap. 4.1.6 str. 21. Buňky z jedné kolonie narostlé na LB agaru byly inkubovány ve 2 ml LB média s ampicilinem o

konečné koncentraci 100 µg/ml při 37°C a otáčkách 220 RPM přibližně 12 hod. Takto připravenou bakteriální kulturou byl zaočkován 1 l ZY autoindukčního média s ampicilinem o konečné koncentraci 100 µg/ml. Kultura byla třepána při 37°C a otáčkách 220 RPM 6 hodin, poté byla teplota snížena na 24 °C a buňky byly kultivovány dalších 14 hodin.

### **4.3. Izolace proteinu**

#### **4.3.1. Centrifugace**

Bakteriální kultura, jejíž příprava je popsána v kap. 4.2.1 str. 25, byla odstředěna v litrových kyvetách v centrifuze Sorval Evolution RC (7 min; 4°C; 4000 RPM – rotor SLC 6000). Supernatant byl slit a peleta zamražena na -18 °C.

#### **4.3.2. Lyse buněk**

Po rozmražení byla peleta resuspendována ve vychlazeném promývacím pufru (tab. 3.3 str. 18) a homogenizována na ledu pomocí homogenizátoru podle Dounceho. Lyse buněk probíhala pomocí sonikátoru Bandelin sonopro (3 x 20 s; na ledu). Následně byl bakteriální lyzát centrifugován (17 000 RPM; 2 x 15 min).

#### **4.3.3. Chromatografie na iontoměničích**

Bakteriální lyzát byl pomocí Superloop 150 ml nanesen na systém equalibrovaných kolon mQ a mS zapojených za sebou na purifikačním systému ÄKTA purifier 10 a po optimalizaci byl standardně použit následující postup: vzorek byl nanesen na kolony za konstantního průtoku mobilní fáze 1 ml min<sup>-1</sup>. Následně byla odpojena mQ kolona a byl nastaven kombinovaný lineární gradient pufru o vyšší koncentraci NaCl (pufr B) tak, aby z počátečního 100% přítoku pufru o nižší koncentraci NaCl (pufr A) na kolonu dosáhl 35% během průtoku 100 ml. Následně byl gradient nastaven tak, aby během 10 ml dosáhl přítoku pufru B 100%. Kolona byla propojena se sběračem frakcí dělicí eluční objem do jamek 96-ti jamkové destičky (angl. 96 deep well plate)

po 1 ml eluátu. Průběh chromatografie byl sledován pomocí absorbancí 280 a 254 nm.

**Tabulka 4.7** Podmínky chromatografie na iontoměničích

Protein	pI	Kolona
xNEIL3 K60A 264stop	9,02	mS mQ

#### **4.3.4. Diskontinuální elektroforesa v denaturačním prostředí dodecylsírany sodného (SDS-PAGE)**

Vybrané frakce vykazující absorbanci a nastříknutý bakteriální lysát byly 1:1 smíchány s 10 µl 2x koncentrovaného vzorkového pufru. Takto připravené vzorky a 2µl standardu byly nanесeny na akrylamidový gel připravený z 4% zaostřovacího a 15% separačního gelu (složení viz tab. 3.5 str. 19). Elektroforesa probíhala 60 min při napětí 200 V ve vertikálním uspořádání. Jako elektroforetický pufr byl použit Tris-glycinový pufr obsahující 0,1% SDS. Separované proteiny byly vizualizovány obarvením Comassie Brilliant Blue a následným odbarvením v destilované vodě.

#### **4.3.5. Koncentrování proteinu**

Roztok proteinu byl koncentrován v koncentrátoru Amicon Ultra s celulosovou membránou propouštějící molekuly o velikosti do 30 kDa na centrifuze Allegra X – 15 R Centrifuge; Beckmann Coulter (2000 g) při 3300 RPM do konečného objemu přibližně 1 ml.

#### **4.3.6. Gelová permeační chromatografie**

Protein byl nanесen na equalibrovanou kolonu Superdex 75 16/600 GL a pomocí gelové permeační chromatografie, kde se rozdělují molekuly podle velikosti, přečištěn na purifikačním systému ÄKTA purifier 10.

#### 4.4. Tvorba a izolace ICL

##### 4.4.1. Hybridizace oligonukleotidů

Mikrozkumavky se sušinou oligonukleotidů byly odstředěny (30 s; 13000 RPM; laboratorní teplota - Eppendorf centrifuge 5418) a resuspendovány v TE pufru na konečnou koncentraci 100  $\mu$ M podle technického data listu poskytovaného společností Sigma Aldrich. Komplementární oligonukleotidy (sekvence viz tab. 3.7 str. 20) byly smíchány 1:1 a bylo přidáno NaCl na konečnou koncentraci 50 mM. Roztok byl zahřátý na teplotu 95 °C pomocí blokového ohříváče a ponechán pomalu k ochlazení na laboratorní teplotu. Následně byla přidána Uracyl-DNA glykosylasa (UDG) a směs ponechána 7 dní inkubovat při 37°C.

**Tabulka 4.8** Složení reakční směsi pro tvorbu ICL

Komponenty	Konečná koncentrace
Oligonukleotid A	50 $\mu$ M
Oligonukleotid B	50 $\mu$ M
NaCl	50 mM
UDG	5 U/ml

##### 4.4.2. Diskontinuální elektroforesa v denaturačním prostředí 7 M Urea

Směs pro separaci na diskontinuální elektroforese byla vytvořena smícháním 3  $\mu$ l vzorkového pufru (složení viz tab. 3.3 str. 18) a 3  $\mu$ l reakční směsi pro tvorbu ICL. Směs byla nanášena na gel a separována 40 min při 300 V ve vertikálním uspořádání. Jako elektroforetický pufr byl použit TBE. Výsledný gel byl vizualizován obarvením SYBR Gold na UV iluminátoru vybaveným fotoaparátem QUANTUM ST4-1100.

##### 4.4.3. Izolace ICL

Reakční směs pro tvorbu ICL byla purifikována na equalibrované koloně mono S 5/50 GL (silný katex) na purifikačním systému ÄKTA purifier 10. Po navázání se směsí na kolonu byl nastaven gradient pufru s NaCl (pufr B) na 45% průtoku na 5

ml. Následně byl nastaven gradient pufru B na 60% během průtoku 60 ml. Kolona byla propojena se sběračem frakcí dělicí eluční objem do jamek 96-ti jamkové destičky po 1 ml eluátu. Průběh chromatografie byl sledován pomocí absorbancí 280 a 254 nm. Vybrané frakce vykazující absorbanci byly analyzovány separací na 20% denaturujícím gelu analogicky jako v kap. 4.3.4.

Značená DNA [HEX]-ICL byla po sedmidenní inkubaci v 37 °C separována na 20% denaturujícím gelu, viz kap. 4.3.4 str. 27. Nejvýše umístěný separovaný vzorek představující ICL byl vyříznut a ponechán při 4 °C cca 24 hodin k extrakci do 1,5 ml TE pufru. Následně byl extract zkoncentrován pomocí Amicon®Ultra 3K (cca 40 min; 13000 RPM; 4°C - Eppendorf centrifuge 5418) .

#### **4.4.4. Tvorba ICL – optimalizace inkubace**

Pro zjištění optimální doby inkubace pro maximální výtěžek tvorby ICL byly po dobu 24 dní každý den odebírány 2 µl roztoku, kde probíhala reakce s UDG. Byly použity nukleotidy kovalentně značené [HEX] pro lepší kvantifikaci, rozlišení a kontrast při vizualizaci (sekvence viz tab. 3.7 str. 20). Odebrané vzorky byly smíchány se vzorkovým pufrem obsahujícím formamid pro zastavení reakce a zamraženy. Následně byly jednotlivé vzorky elektroforeticky rozděleny na 20% denaturujícím akrylamidovém gelu (40 min; 300 V). Výsledné rozdělení na gelu bylo vizualizováno pomocí fluorimetru TYPHOON.

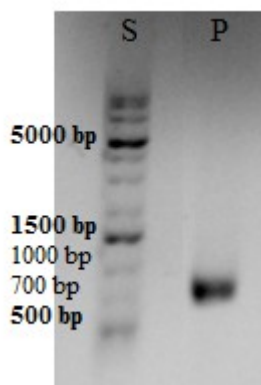
#### **4.4.5. Interakce ICL na xNEIL3 K60A 264 stop**

Komplex byl vytvořen smícháním proteinu v různých koncentracích s [HEX] značenými substráty (ICL, jedno řetězcová a dvou řetězcová DNA) 20 mM Tris-HCl pH = 7,4, 75 mM NaCl a 5% glycerol. Vzorky byly elektroforeticky analyzovány na 15% akrylamidovém nativním gelu (30 min; 300 V) neobsahujícím EDTA. Výsledné rozdělení navázané DNA bylo vizualizováno pomocí fluorimetru TYPHOON.

## 5. Výsledky

### 5.1. Příprava vektoru pro bakteriální expresi xNEIL3 K60A 264 stop

Expresní konstrukt pro xNEIL3 s mutací v pozici 60 změnou lysinu na alanin a stop kodonem na pozici 264 (K60A 264stop), kódující sekvenci byl navržen podle bakteriálních homologů a obsahoval restrikční místa pro endonukleasy Hind III a Nde I. Konstrukt byl získán PCR reakcí z dostupného templátu za použití primerů uvedených v tab. 3.6 str. 20. Templátová DNA pro xNEIL3 K60A FL byla do naší laboratoře zaslána na požádání od Dr. J. C. Waltera z laboratoře Harvard Medical School, v Bostonu. Podmínky a složení reakční směsi viz kapitola 4.1.1 str. 22. Při PCR reakci byla templátová DNA zkrácena a amplifikována. Pohyblivost na horizontální elektroforese odpovídala velikosti požadovaného konstrukt pro xNEIL3 K60A 264 stop (viz obrázek 5.1). Produkt reakce byl přečištěn na silikagelové mikrokolonce.

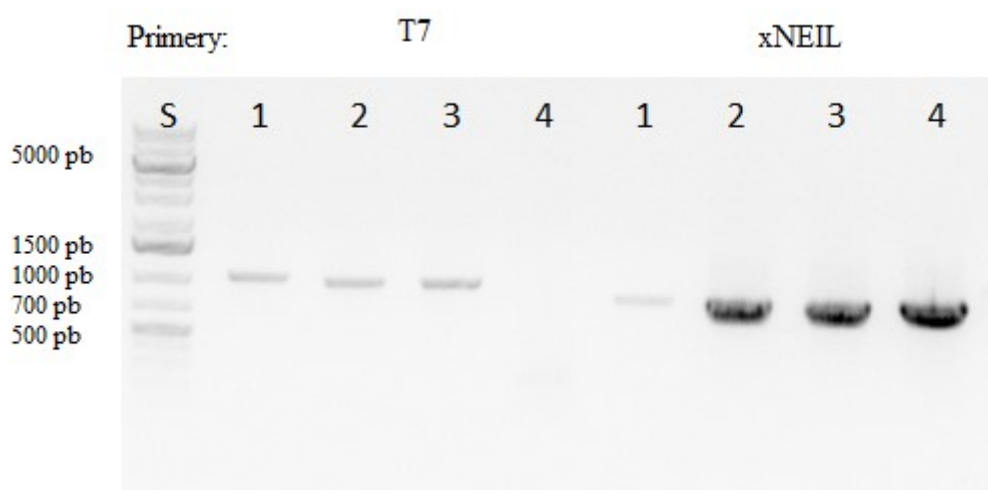


**Obrázek 5.1** 1% agarosová elektroforeza v přítomnosti ethidium bromidu produktu PCR. S – standard, P – PCR produkt

Po restrikčním štěpení PCR produktu i vektoru endonukleasami Hind III a Nde I (kap. 4.1.4 str. 23) byly produkty opětovně přečištěny a byla provedena ligace plasmidové a templátové DNA (kap. 4.1.5 str. 23).

Vektor pET-21a(+), viz obr. P1, který obsahuje kódující sekvenci  $\beta$ -laktamasu zajišťující ampicilinovou rezistenci, s insertem byl transformován do kompetentních buněk *E.coli* DH5 $\alpha$  (kap. 4.1.6 str. 24), které byly kultivovány na LB agaru

s přidavkem ampicilinu. Ze čtyř narostlých kolonií byla provedena 2x PCR reakce (kap. 4.1.7 str. 24) pro ověření přítomnosti insertní DNA. Při PCR reakcích byly jednou použity primery specifické pro insert (konstrukt xNEIL3 K60A 264 stop) a podruhé T7 primery. Produkty PCR reakce byly analyzovány pomocí agarosové elektroforesy (kap. 4.1.2 str. 22), viz obr. 5.2. Buňky z kolonie č. 2, 3 byly identifikovány jako pozitivní a kultivovány v LB mediu přibližně 12 hod. Následně byla izolována plasmidová DNA (kap. 4.1.7 str. 24) a provedena její sekvenace (kap. 4.1.8 str. 25).



**Obrázek 5.2** Agarosová elektroforesa produktů PCR kolonií. S – standard, čísla 1 – 4 čísla klonů, T7 a xNEIL3 různé použité primery.

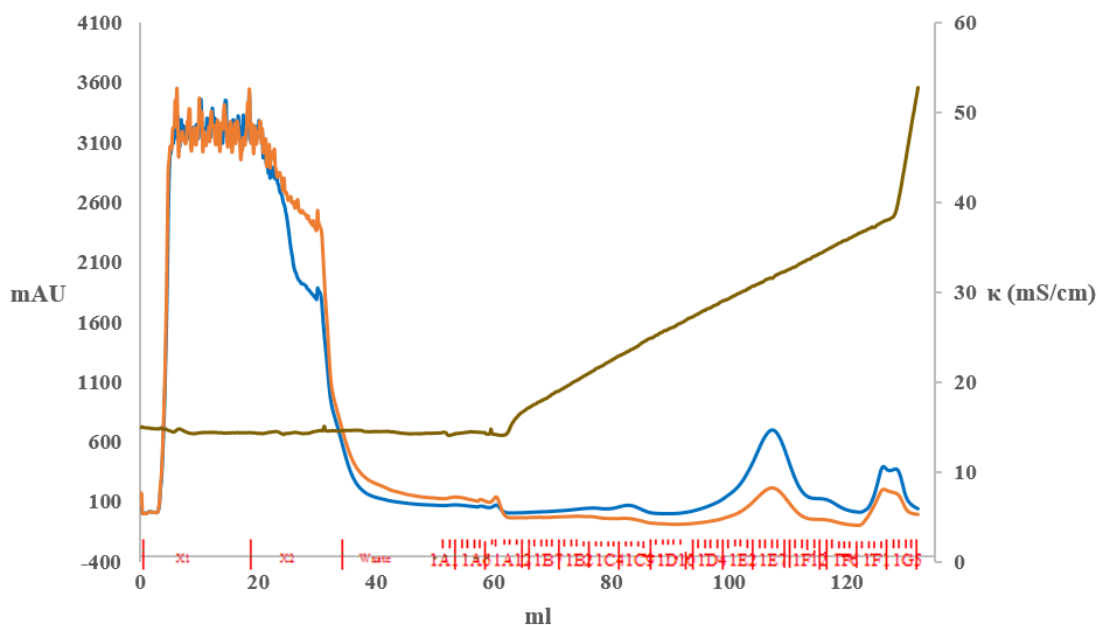
## 5.2. Exprese a izolace xNEIL3 K60A 264 stop

### 5.2.1. Exprese

Vektor s insertem byl transformován do kompetentních buněk *E.coli* BL21 (DE3) NiCo (kap. 4.2.1 str. 25) Následující den byla namnožená bakteriální kultura použita k zaočkování autoindukčního média ZY a buňky dále kultivovány.

### 5.2.2. Izolace čistého proteinu

Vzniklá kultura byla odstředěna pro oddělení od expresního média (kap. 4.3.1 str. 26) a buňky následně lyzovány a ultrazvukovými pulzy homogenizovány pomocí Bandelin sonopro (kap. 4.3.2 str. 26). Vzniklý bakteriální lyzát byl nanesen na iontové kolony v uspořádání mQ a mS (aniontový a kationtový iontoměnič). Po navázání se bakteriálního lyzátu na kolony byla mQ odpojována, jelikož se na ni navázaly nečistoty, nikoli protein. Výsledný chromatogram je znázorněn na obr. 5.3.

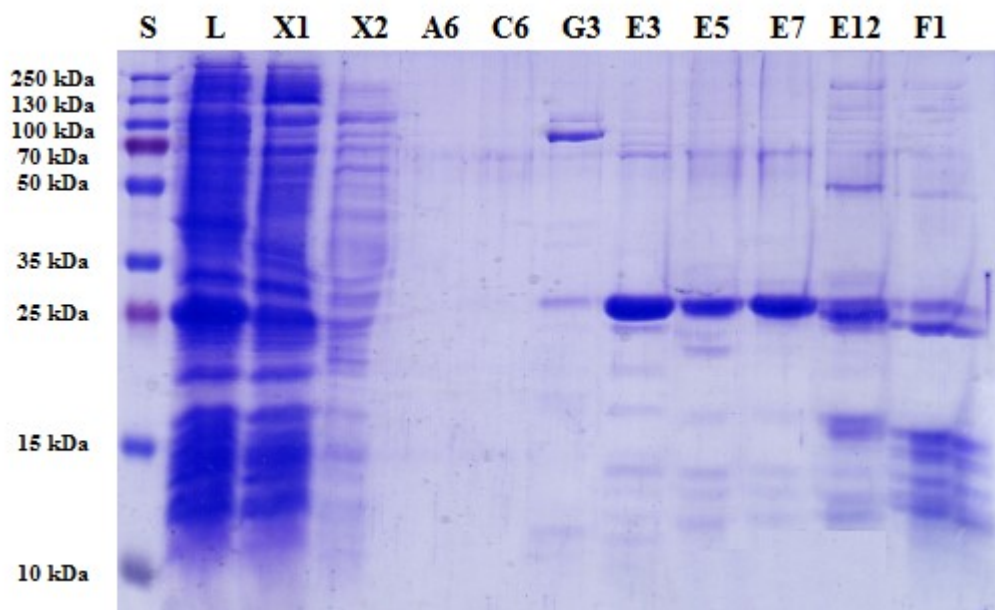


**Obrázek 5.3** Závislost absorbance na elučním objemu (protein xNEIL3 K60A 264 stop) za gradientové eluce 50 mM NaCl až 1 M NaCl na koloně mS equalibrované pufrem pro chromatografii na iontoměničích (tab. 3.3 str. 18).

Modře je znázorněna absorbance při 280 nm oranžově absorbance při 254 nm a, hnědě konduktivita.

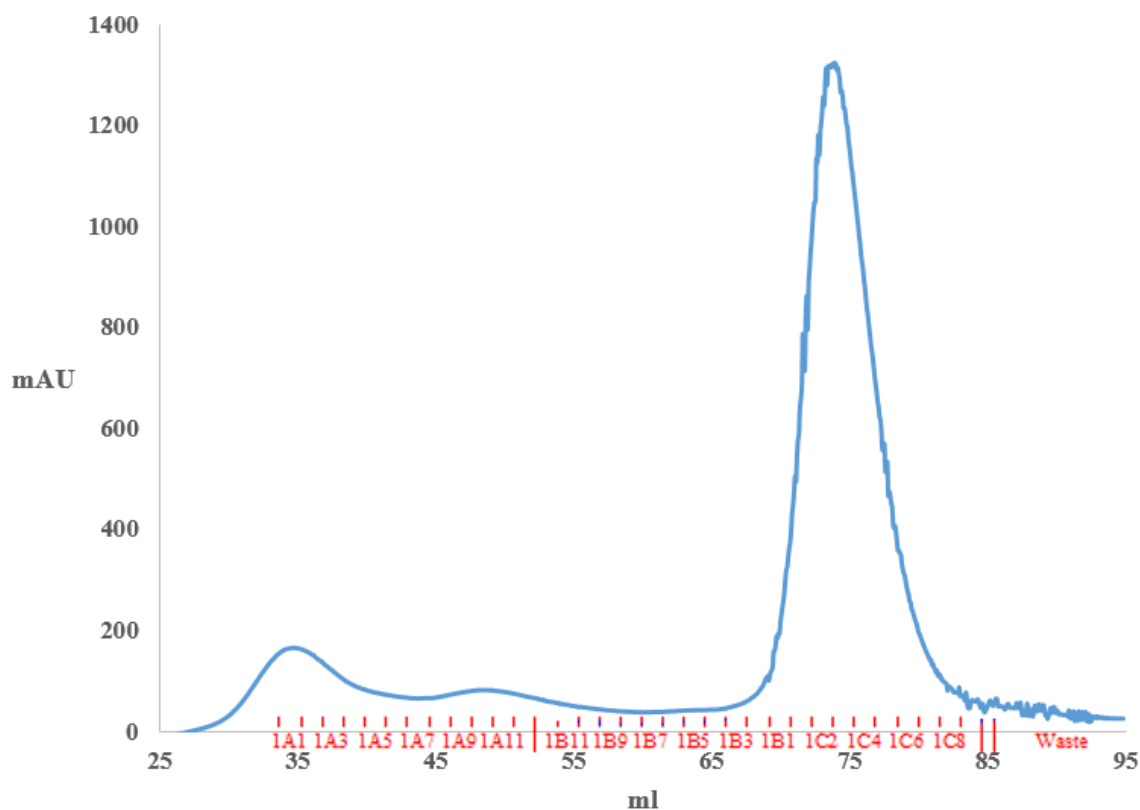
Frakce, které vykazovaly vyšší absorbanci, byly analyzovány pomocí 15% SDS-PAGE, viz obr. 5.4 str. 33.



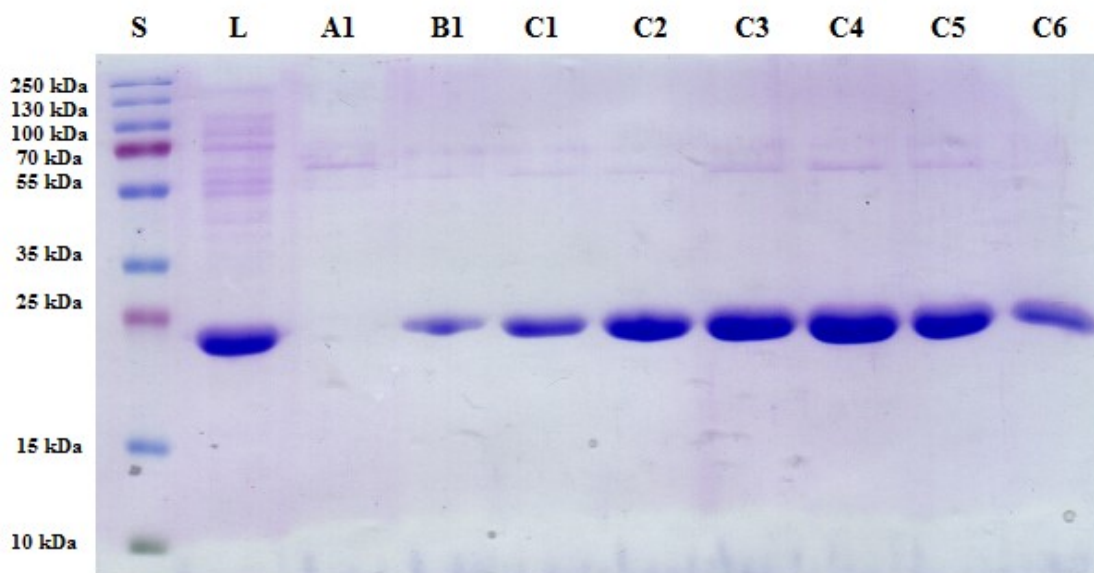


**Obrázek 5.4** Elektroforetická kontrola frakcí vykazujících vyšší absorbanci při 280 nm při gradientové eluci na mS equalibrované koloně. S – standard, L – vzorek nanesený na kolonu, (X1 – F1) – jednotlivé frakce podle obr. 5.3 str. 32. Za použití SDS-PAGE 15% akrylamidového gelu a barvení CBBR250.

Frakce obsahující protein byly spojeny, zkoncentrovány (kap. 4.3.5 str. 27) na objem přibližně 3 ml a purifikovány pomocí gelové permeační chromatografie za použití kolony Superdex 75 16/600. Chromatogram z gelové permeační chromatografie je znázorněn na obr. 5.5 str. 34. Frakce vykazující absorbanci byly analyzovány pomocí 15% SDS-PAGE, viz obr. 5.6 str. 34.



**Obrázek 5.5** Závislost absorbance na elučním objemu (protein xNEIL3 K60A 264 stop) při iontové permeační chromatografii za použití kolony Superdex 75 16/600. Modře je znázorněna absorbance při 280 nm.



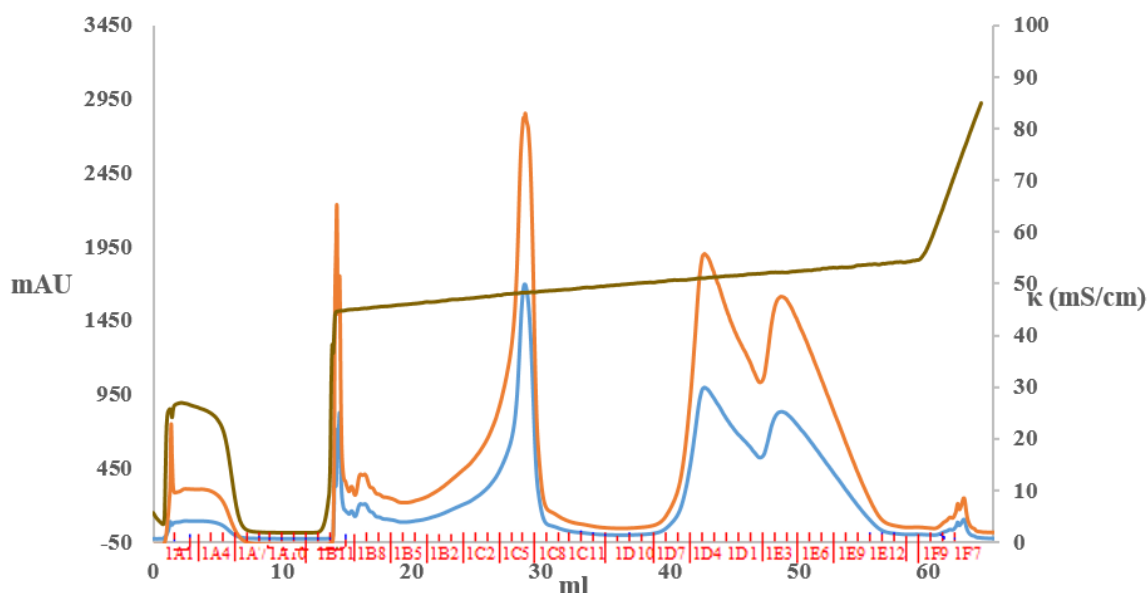
**Obrázek 5.6** Elektroforetická kontrola frakcí vykazujících vyšší absorbanci při 280 nm při iontové permeační chromatografii za použití kolony Superdex 200 10/300 GL. S – standard, L – vzorek nanesený na kolonu, (A1 – C6) – jednotlivé frakce podle obr. 5.5. Za použití SDS-PAGE 15% akrylamidového gelu a barvení CBBR250.

### 5.3. Příprava ICL

Oligonukleotidy (sekvence viz tab. 3.7 str. 20) v podobě sušiny získané od firmy Sigma Aldrich byly resuspendovány v TE pufru podle doporučení na konečnou koncentraci 100  $\mu$ M. Hybridizace komplementárních oligonukleotidů bylo dosaženo smíšením komplementárních sekvencí 1:1 v přítomnosti 50 mM NaCl a zahřátím na 95°C pomocí blokového ohříváče, SBH130D s pomalým ochlazením. Poté bylo přidáno UDG a směs ponechána při 37°C inkubovat 7 dní (kap. 4.4.1 str. 28). Následně byla směs analyzována pomocí 20% denaturujícího akrylamidového gelu, kde jako kontrolní vzorek byla přidána jednořetězcová DNA a hybridizovaná DNA (kap. 4.4.2 str. 28) a pohyblivost jednotlivých vzorků byla vizualizována barvením SYBR Gold a analyzována pomocí UV fotoaparátu QUANTUM ST4-1100, viz obr. 5.7.

### 5.4. Izolace substrátu – ICL

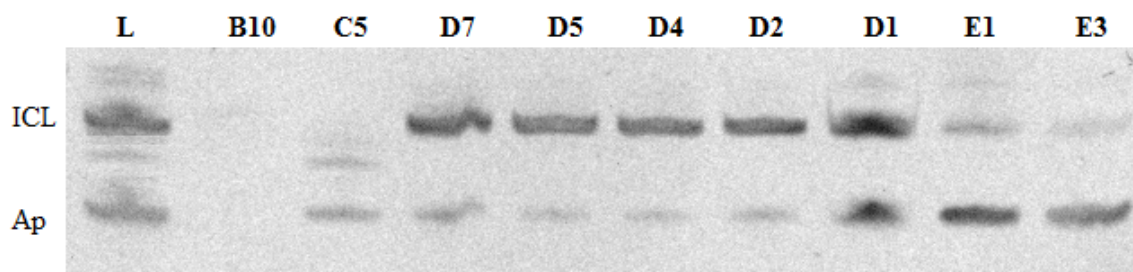
Po 7 denní inkubaci byl vzorek purifikován pomocí ÄKTA Purifier 10 za použití kolony monoQ (kap. 4.4.3 str. 28). Výsledný chromatogram je zaznamenán na obr. 5.8



**Obrázek 5.8** Závislost absorbance na elučním objemu (ICL) za gradientové eluce 0 – 1 M NaCl na equalibrované koloně monoQ.

Oranžově je znázorněna absorbance při 254 nm, modře absorbance při 280 nm a hnědě konduktivita.

Frakce vykazující absorpenci byly analyzovány pomocí 20% denaturujícího akrylamidového gelu (kap. 4.4.2 str. 28), kde jako kontrola byla použita směs před purifikací, viz obr. 5.9.

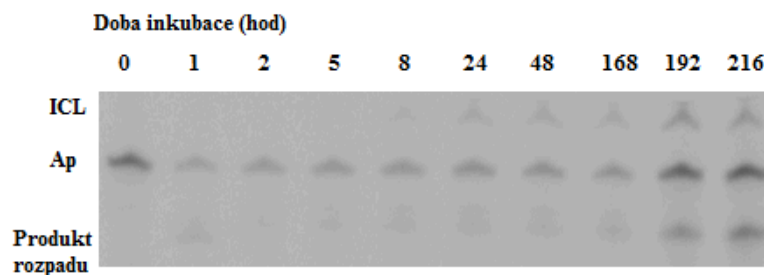


**Obrázek 5.9** Elektroforetická kontrola frakcí vykazujících vyšší absorpenci při 280 nm a 254 nm. L – nanesený vzorek na kolonu, (B10 – E3) – jednotlivé frakce podle obr. 5.8. 20% denaturující akrylamidový gel, DNA vizualizována fluorescenčním barvivem SYBR Gold.

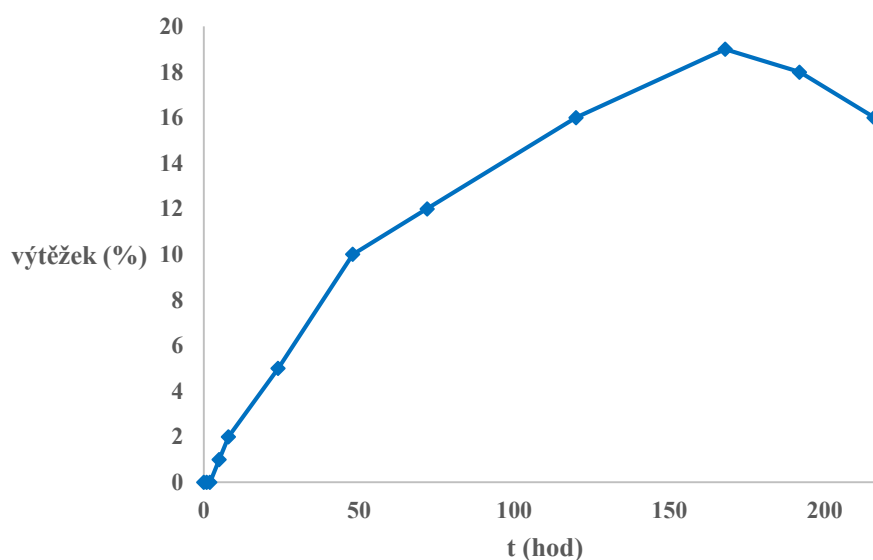
Jednotlivé frakce obsahující ICL byly spojeny a koncentrovány za použití Amicon®Ultra s celulosovou membránou propouštějící molekuly o velikosti do 3 kDa obdobně jako v kap. 4.3.5 str. 29. na 500  $\mu$ l. Dále byl vzorek ještě více koncentrován pomocí Amicon®Ultra 3K-0,5 s maximálním objemem 500  $\mu$ l na konečný objem přibližně 100  $\mu$ l.

### 5.5. Optimalizace doby inkubace pro maximální výtěžek tvorby ICL

Po dobu 24 dní byly v definovaných intervalech odebírány 2  $\mu$ l roztoku, kde probíhala reakce s UDG. Pro zastavení reakce byl každý odebraný vzorek doplněn o denaturující vzorkový pufr v poměru 1:1. Po ukončení reakce byly jednotlivé vzorky elektroforeticky rozděleny na 20% denaturujícím akrylamidovém gelu, viz obr. 5.10 str. 37, a podle množství separovaných fragmentů vytvořen graf závislosti tvorby ICL na čase, viz obr. 5.11 str. 37. Elektrochromatogram byl analyzován v programu GelAnalyzer.



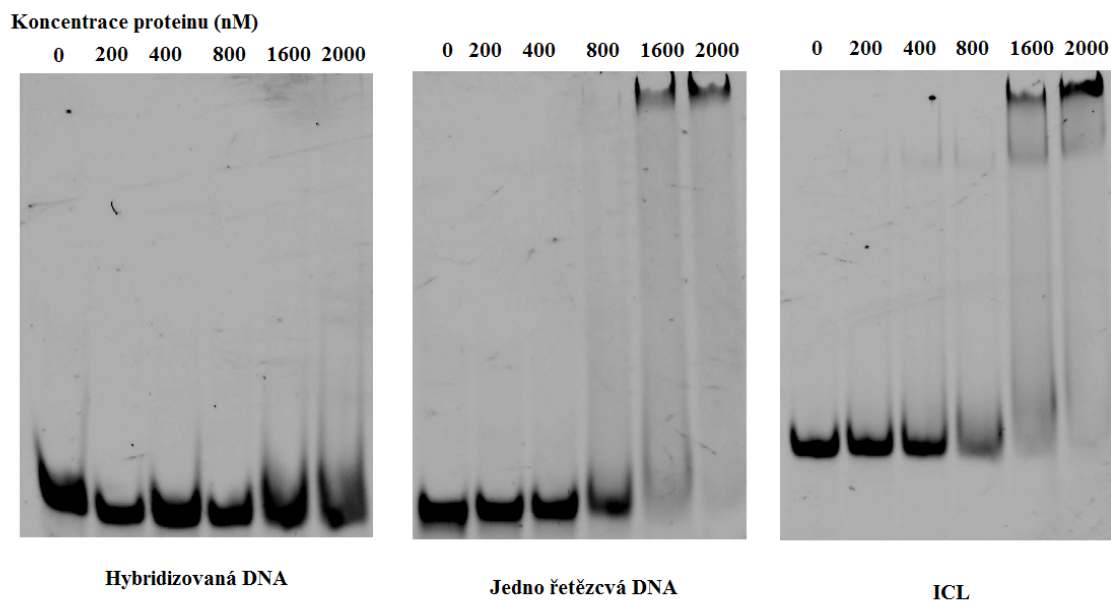
**Obrázek 5.10** Odebírané vzorky v časových intervalech pro zjištění kinetiky reakce. 20% denaturující akrylamidový gel.



**Obrázek 5.11** Závislost výtěžku ICL na čase.

## 5.6 Interakce xNEIL3 K60A 264 stop s ICL

Byl smíchán purifikovaný xNEIL3 K60A 264stop o koncentracích 200, 400, 800, 1600, 2000 nM s purifikovaným značeným substrátem: ICL, jedno řetězcovou DNA a hybridizovanou DNA o koncentracích 200 nM. Komplex byl vizualizován na 15% nativním akrylamidovém gelu a skenován pomocí TYPHOON, viz obr. 5.12 str. 38.



**Obrázek 5.12** Vazba proteinu na substráty: Hybridizovanou DNA, Jedno řetězcovou DNA a ICL. 15% nativní akrylamidový gel. Spodní separovaný vzorek představuje substrát, vrchní separovaný vzorek představuje tvořící se komplex xNEIL3 se substrátem.

## 6. Diskuse

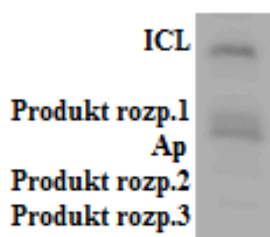
Cílem této práce bylo připravit a izolovat protein mutantní xNEIL3 a jeho substrát ICL.

Jelikož xNEIL3 K60A plné délky v bakteriích *E.coli* vykazoval nízké výtěžky, bylo přistoupeno na variantu vytvoření a purifikace zkráceného mutantu 264 stop. Jak vyplývá z teoretického úvodu žádný jiný protein z Fpg/Nei rodiny neobsahuje prodlouženou doménu a na jejím konci 2 zinečnaté prsty jako NEIL3, bylo tedy předpokládáno, že by zkrácený řetězec mohl rozpoznávat substrát, byť by poškození neopravoval. Mutace K60A byla zvolena, jelikož DNA vázající aminokyselina je právě lysin v pozici 60.

Prodloužený řetězec bude mít pravděpodobně vliv na aktivitu a bude regulovat schopnost opravit poškození. Předpoklad rozpoznání substrátu se potvrdil a dokonce bylo zjištěno, že se přednostně váže na ICL.

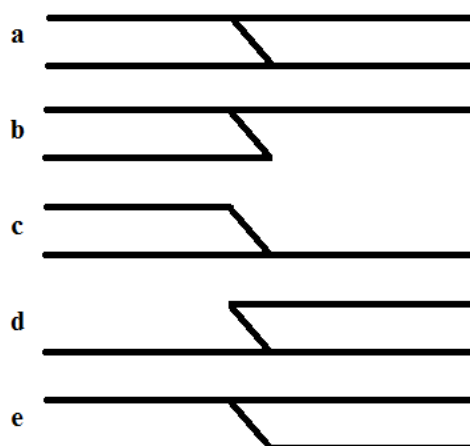
Sekvence oligonukleotidů pro tvorbu substrátu byla převzata a mírně upravena<sup>17</sup>.

Ideální inkubační doba pro získání maximálního množství (7 dní) substrátu byla zjištěna experimentálně, viz obr. 5.10 str. 37. Po delším časovém intervalu je na denaturujícím gelu patrný třetí band umístěný nejnižší, viz obr. 6.1.



**Obrázek 6.1** 20% denaturující akrylamidový gel.

Jedná se o produkt samovolného rozpadu, který by mohl reprezentovat první a druhý pík na obr. 5. 8 str. 38. Jak vypadají produkty rozpadu, je několik možností (obr. 6.2 str. 40), které závisejí na průběhu opravy Ap-ICL, která je zatím neznámá.



**Obrázek 6.2** Možné produkty rozpadu, schématické znázornění. a) je schématické zobrazení ICL. b-e) představuje možné produkty rozpadu 1, nacházející se na gelu mezi Ap a ICL. Chybějící části řetězců představují produkty rozpadu 2 a 3 nacházející se na gelu nejnižší.



## 7. Závěr

Cílem této práce bylo připravit a izolovat protein mutantní xNEIL3 a jeho substrát ICL.

Byl připraven expresní vektor pro bakteriální expresi s insertem mutantní varianty xNEIL3 s mutací v pozici 60 zaměněním lysinu za alanin a stop kodonem v pozici 264. Protein byl exprimován v kompetentních buňkách *E. coli* a izolován. Byl připraven substrát pro xNEIL3 – ICL. Příprava substrátu byla optimalizována pro maximální výtěžek a substrát izolován. Byla prokázána preferenční vaznost mutantního proteinu na substrát - ICL před hybridizovanou DNA i před jedno řetězcovou DNA ve fyziologické soli. Jedno řetězcová DNA byla dosud považována za preferenční substrát.

Komplex proteinu se substrátem byl připraven pro krystalizaci k objasnění mechanismu opravy. Za tímto účelem probíhá práce na přípravě a izolaci mutantního xNEIL3 plné délky a přirozeného xNEIL3.

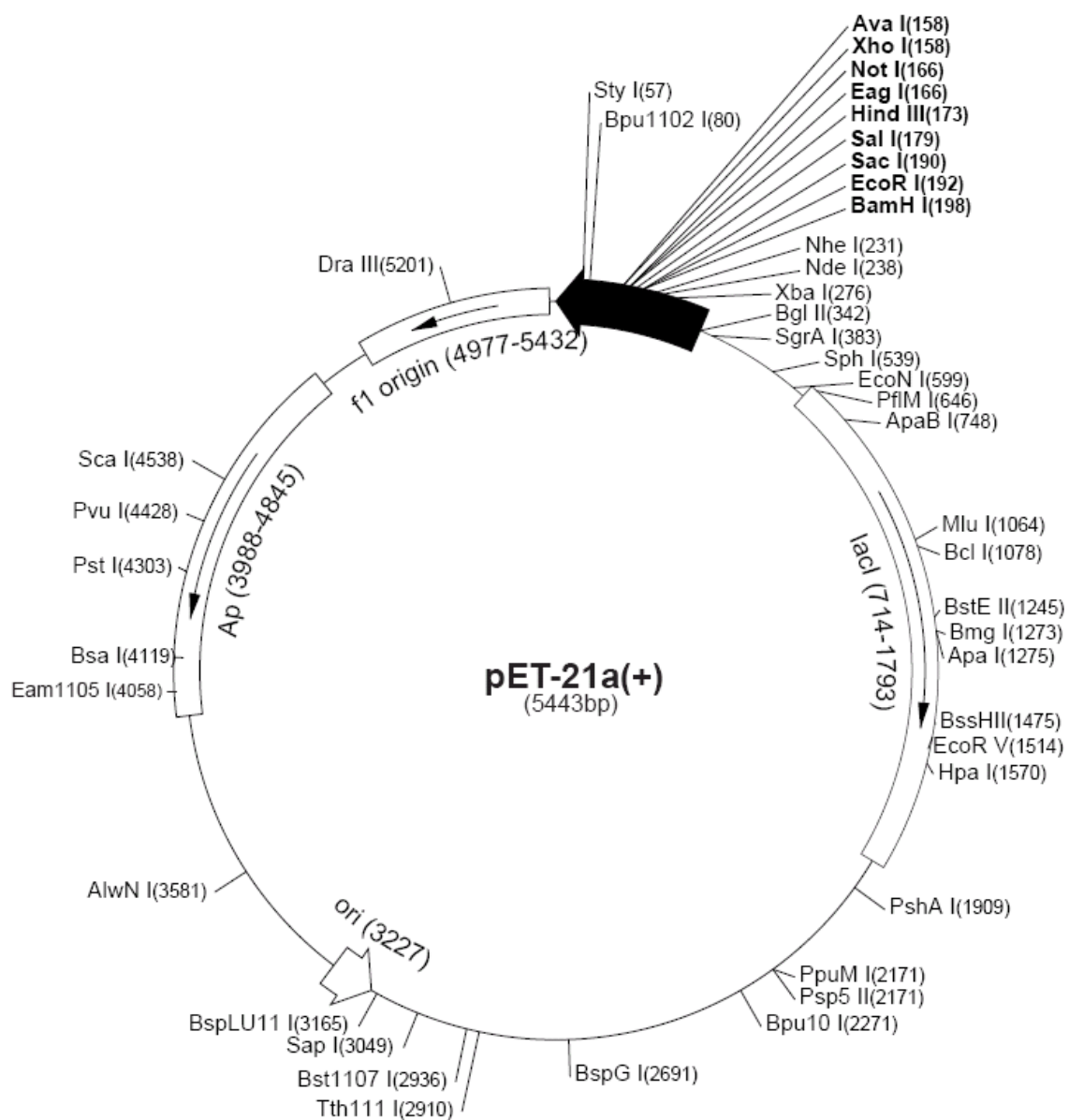
## Bibliografie

1. Zietlow, L. R., The Role of A-family DNA Polymerases in DNA Interstrand Cross-link Repair. *Proquest, Umi Dissertation Publishing*: **2011**; p 144.
2. Murray, R. K., Harper's illustrated biochemistry. *Lange Medical Books/McGraw-Hill*: New York, **2003**.
3. Lindahl, T.; Nyberg, B., Rate of depurination of native deoxyribonucleic acid. *Biochemistry* **1972**, *11* (19), 3610-&.
4. Lindahl, T.; Karran, P.; Wood, R. D., DNA excision repair pathways. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **1997**, *7* (2), 158-169.
5. Duxin, J. P.; Dewar, J. M.; Yardimci, H.; Walter, J. C., Repair of a DNA-Protein Crosslink by Replication-Coupled Proteolysis. *Cell* **2014**, *159* (2), 346-357.
6. Raschle, M.; Knipsheer, P.; Enoiu, M.; Angelov, T.; Sun, J. C.; Griffith, J. D.; Ellenberger, T. E.; Scharer, O. D.; Walter, J. C., Mechanism of replication-coupled DNA interstrand crosslink repair. *Cell* **2008**, *134* (6), 969-980.
7. Holloman, W. K., Unraveling the mechanism of BRCA2 in homologous recombination. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2011**, *18* (7), 748-754.
8. Alberts, B., Molecular biology of the cell. *Garland Science*: New York, **2007**.
9. Price, N. E.; Johnson, K. M.; Wang, J.; Fekry, M. I.; Wang, Y. S.; Gates, K. S., Interstrand DNA-DNA Cross-Link Formation Between Adenine Residues and Abasic Sites in Duplex DNA. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136* (9), 3483-3490.
10. Deans, A. J.; West, S. C., FANCM Connects the Genome Instability Disorders Bloom's Syndrome and Fanconi Anemia. *Mol. Cell* **2009**, *36* (6), 943-953.
11. Duxin, J. P.; Walter, J. C., What is the DNA repair defect underlying Fanconi anemia? *Curr. Opin. Cell Biol.* **2015**, *37*, 49-60.
12. Fishel, M. L.; Delaney, S. M.; Friesen, L. D.; Hansen, R. J.; Zuhowski, E. G.; Moschel, R. C.; Egorin, M. J.; Dolan, M. E., Enhancement of platinum-induced cytotoxicity by O-6-Benzylguanine. *Mol. Cancer Ther.* **2003**, *2* (7), 633-640.
13. Johnson, S. W.; Swiggard, P. A.; Handel, L. M.; Brennan, J. M.; Godwin, A. K.; Ozols, R. F.; Hamilton, T. C., Relationship between platinum-DNA adduct formation and removal and cisplatin cytotoxicity in cisplatin-sensitive and cisplatin-resistant human ovarian-cancer cells. *Cancer Res.* **1994**, *54* (22), 5911-5916.

14. Sun, G. H.; Zhao, L. J.; Zhong, R. G., The Induction and Repair of DNA Interstrand Crosslinks and Implications in Cancer Chemotherapy. *Anti-Cancer Agents Med. Chem.* **2016**, *16* (2), 221-246.
15. Nakamura, J.; Swenberg, J. A., Endogenous apurinic apyrimidinic sites in genomic DNA of mammalian tissues. *Cancer Res.* **1999**, *59* (11), 2522-2526.
16. Pichierri, P.; Rosselli, F., The DNA crosslink-induced S-phase checkpoint depends on ATR-CHK1 and ATR-NBS1-FANCD2 pathways. *Embo J.* **2004**, *23* (5), 1178-1187.
17. Semlow, D. R.; Zhang, J. Q.; Budzowska, M.; Drohat, A. C.; Walter, J. C., Replication-Dependent Unhooking of DNA Interstrand Cross-Links by the NEIL3 Glycosylase. *Cell* **2016**, *167* (2), 498-+.
18. Gilboa, R.; Zharkov, D. O.; Golan, G.; Fernandes, A. S.; Gerchman, S. E.; Matz, E.; Kycia, J. H.; Grollman, A. P.; Shoham, G., Structure of formamidopyrimidine-DNA glycosylase covalently complexed to DNA. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277* (22), 19811-19816.
19. Prakash, A.; Doublie, S.; Wallace, S. S., The Fpg/Nei Family of DNA Glycosylases: Substrates, Structures, and Search for Damage. In Mechanisms of DNA Repair, Doetsch, P. W., Ed. *Elsevier Academic Press Inc*: San Diego, **2012**; Vol. 110, pp 71-91.
20. Liu, M. M.; Imamura, K.; Averill, A. M.; Wallace, S. S.; Doublie, S., Structural Characterization of a Mouse Ortholog of Human NEIL3 with a Marked Preference for Single-Stranded DNA. *Structure* **2013**, *21* (2), 247-256.
21. Duweb, A. Analysis of NEIL3 Expression: A Possible Resistance Factor to Cancer Chemotherapy in Paediatric Cancer Cells. *University of Salford*, Salford, UK, **2015**.
22. Ide, H., DNA substrates containing defined oxidative base lesions and their application to study substrate specificities of base excision repair enzymes. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology, Vol 68* **2001**, *68*, 207-221.
23. Admiraal, S. J.; O'Brien, P. J., Base Excision Repair Enzymes Protect Abasic Sites in Duplex DNA from Interstrand Cross-Links. *Biochemistry* **2015**, *54* (9), 1849-1857.
24. al., H. e. Medical Pharmacology Nagasaki University. [http://www.med.nagasaki-u.ac.jp/phrmch1/lcn/interspersed\\_NLS.htm](http://www.med.nagasaki-u.ac.jp/phrmch1/lcn/interspersed_NLS.htm) accessed 6. 4. 2017.
25. QIAGEN QIAquick® Spin Handbook. <http://sevierlab.vet.cornell.edu/resources/EN-QIAquick-Spin-Handbook.pdf> accessed 4. 4. 2017.

26. Scientific, T. Product Information T4 DNA Ligase. <http://www.thermoscientificbio.com/uploadedFiles/Resources/el001-product-information.pdf> accessed 4. 4. 2017.
27. Qiagen QIAprep® Miniprep Handbook. [http://public.wsu.edu/~kahn\\_sci/Flow/E2-QIAprep\\_Miniprep\\_Handbook.pdf](http://public.wsu.edu/~kahn_sci/Flow/E2-QIAprep_Miniprep_Handbook.pdf), accessed 4 . 4. 1017.
28. Millipore, H. pET-21a(+) DNA Novagen. [https://www.merckmillipore.com/CZ/cs/product/pET-21a%28%2B%29-DNA---Novagen,EMD\\_BIO-69740#anchor\\_VMAP](https://www.merckmillipore.com/CZ/cs/product/pET-21a%28%2B%29-DNA---Novagen,EMD_BIO-69740#anchor_VMAP) accessed 4. 5. 2017.

## Přílohy



**Obrázek P1.** Mapa použitého plasmidu pro bakteriální expresi pET-21a(+)<sup>28</sup>.

Svoluji k zapůjčení této práce za studijními účely a prosím, aby byla řádně vedena evidence vypůjčovatelů.

Jméno a příjmení s adresou	Číslo OP	Datum vypůjčení	Poznámka